





دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی قزوین  
دانشکده بهداشت

## طراحی کیت Taq Man Real -Time PCR به منظور تعیین سریع بار میکروبی شیرهای پاستوریزه

**استاد راهنما**

دکتر پیمان قجر بیگی

**استاد مشاور**

دکتر رضی الله جعفری جوزانی

دکتر رزاق محمودی

**دانشجو**

آیدا فرهودی

# مقدمه

# ارزش تغذیه‌ای شیر

❖ در میان غذاهایی که روزانه به مصرف می‌رسد، شیر مناسب‌ترین و متعادل‌ترین ترکیبات را دارد و به همین جهت شیر را غذای کامل می‌نامند.

❖ شیر یکی از مهمترین منابع پروتئین‌های حیوانی محسوب می‌شود تاکنون ۲۰ اسید آمینه در بدن شناخته شده که ۱۸ نوع آن در شیر است. پروتئین موجود در شیر و فرآورده‌های آن در مقایسه با سایر منابع حیوانی و گیاهی ارزان‌تر و از ارزش بیولوژیکی بالایی برخوردار است.

❖ همچنین شیر حاوی انواعی از ویتامین‌های با ارزش A و B، و انواعی از مواد معدنی است که مهمترین آنها کلسیم می‌باشد.



❖ نقش شیر در پیشگیری و درمان برخی از بیماری‌ها مانند سرطان کولون و پوکی استخوان ثابت گردیده است و می‌تواند در درمان مسمومیت‌ها و رفع یبوست به کار رود.

❖ همچنین شیر در بهبود عملکرد سیستم ایمنی و دستگاه گوارش تاثیر فراوانی دارد و می‌تواند اثر پروبیوتیکی و آنتی بیوتیکی داشته باشد.

❖ بررسی‌های سازمان ملل نشان می‌دهد که متوسط طول عمر در کشورهایی که مصرف سرانه شیر بالاتری دارند بیشتر می‌باشد.

# آمار تولید شیر خام ایران و جهان

- سازمان جهانی خوارو بار و کشاورزی (فائو) در جدیدترین گزارش خود از سلسله گزارش های "چشم انداز غذا در جهان" کل تولید شیر و فرآورده های لبنی را طی سال ۲۰۱۴ به میزان ۷۸۳ میلیون تن معرفی کرد.
- بر اساس این گزارش ایران در سال گذشته میلادی ۷/۵ میلیون تن شیر و محصولات لبنی تولید کرده است. به گزارش فائو، ایران در سال گذشته ۶۰۸ هزار تن شیر و محصولات لبنی وارد کرد و پیش‌بینی می‌شود این رقم در سال جاری به ۶۲۴ هزار تن افزایش یابد.
- از این میزان شیر تولیدی ۵ میلیون تن وارد سیستم صنعتی کشور می شود.

## سرانه مصرف شیر در ایران و جهان

- در حال حاضر مصرف سرانه ی محصولات لبنی در دنیا رقمی بالای ۱۹۰ کیلوگرم در سال است.
- مصرف سرانه ی شیر در کشور اروپا (کل اروپا به عنوان کشور واحد در نظر گرفته شده است) ۳۰۰ تا ۴۵۰ کیلوگرم به ازاء هر اروپایی در سال است.
- مصرف سرانه ی شیر برای آمریکا حدود ۳۰۰ کیلوگرم در سال است .
- که این رقم در ایران به ازاء هر ایرانی از ۹۹ کیلوگرم در سال تجاوز نمی کند.

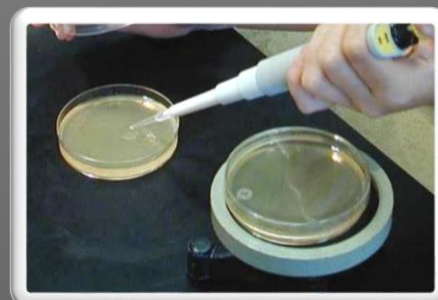
# اهمیت شناسایی میکروارگانیسم‌ها

❖ شیر تحت شرایط مساعد محیطی، به دلیل pH و ترکیباتی نظیر پروتئین و چربی می‌تواند محل مناسبی برای رشد و تکثیر عوامل بیماریزا باشد و به آسانی فاسد شود. در صورت مصرف شیر با عدم فرآوری مناسب و کافی، می‌تواند سبب بروز بیماری در افراد شود.

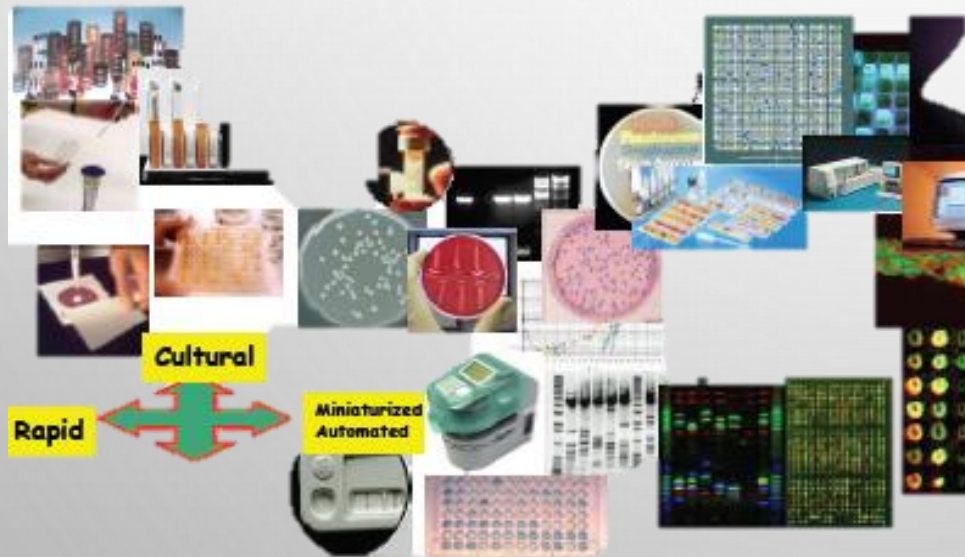
❖ بیماری‌های ناشی از مصرف غذا (Food-borne Disease) طیف وسیعی از بیماری‌ها در نقاط مختلف جهان را در برمی‌گیرند. به بزرگ‌ترین اپیدمی مسمومیت‌های غذایی در سال ۱۹۸۵ در ایالات متحده اشاره نمود که به دلیل آلوده شدن شیر پاستوریزه در کارخانه رخ داد و طی آن ۱۷۰۰۰۰ نفر دچار مسمومیت گردیدند.

❖ لذا ارزیابی کیفیت بهداشتی شیر به منظور اطمینان از بهداشت و ایمنی شیر همواره حائز اهمیت است.

# روثس های شمارش و ارزیابی میکروارگانیسم ها



با توجه به مخاطرات بهداشتی ناشی از باکتری‌های بیماریزا در مواد غذایی، شناسایی میکروارگانیسم‌های بیماریزا و عوامل فساد و همچنین ارزیابی کیفیت بهداشتی محصولات تولید شده، همواره مورد توجه سازمانهای نظارتی بوده است. شناسایی میکروارگانیسم‌ها در ماد غذایی با دو روش کلی سنتی و مدرن انجام می‌گیرد.



• روشهای سنتی

• روشهای نوین

# روش های سنتی

اساس میکروبیولوژی مواد غذایی بر ارزیابی حضور، نوع و تعداد میکروارگانیسم‌ها و متابولیت‌های حاصل از آن‌ها استوار است. چهار روش متداول برای شمارش میکروارگانیسم‌های کل عبارتند از :

- ❖ روش شمارش صفحه‌ای استاندارد (SPC)
- ❖ روش تعیین احتمال سلول‌های زنده (MPN)
- ❖ روش احیاء رنگ‌ها (DR)
- ❖ روش شمارش مستقیم میکروسکوپی (DMC)



## معایب روش های سنتی

❖ روش های سنتی مبتنی بر کشت، بسیار پرزحمت بوده و به چند روز زمان نیاز دارند. در روش های سنتی، سلول های غیر قابل کشت و حرارت دیده و یا ضعیف تر، قبل از هر گونه شمارش باید تحت شرایط کشت ویژه ای قرار بگیرند.

❖ از دیگر اشکالات روش های مبتنی بر کشت این است که این روش ها همگی قادر به شناسایی باکتری های زنده و سالم هستند و در بسیاری از موارد چندین باکتری مجاور منجر به یک کولونی می گردند.

❖ میکروارگانیسم ها طی عملیات های فرآوری مواد غذایی دچار صدمه می گردند ،  
در نتیجه جداسازی باکتری مورد نظر پیچیده تر بوده و زمان بیشتری را طلب  
می کند. اهمیت این موضوع در مواقعی که با محدودیت زمانی مواجه هستیم  
بیشتر می شود.

# روشهای نوین

- روشهای فیزیکی
- روشهای شیمیایی
- روشهای ایمونولوژیکی
- روشهای مولکولی

# روش‌های فیزیکی

- اندازه گیری مقاومت الکتریکی (امپدانس)
- فلوسیتومتری
- میکروکالریمتری

# روش‌های شیمیایی

❖ نوکلئاز مقاوم به حرارت

❖ روش آزمون LAL (LIMULUS AMOEBOCYTE LYSATE) : روش LAL

همینطور این روش برای ارزیابی سریع کیفیت بهداشتی شیر از نظر میزان کلی‌فرم، قبل و بعد از پاستوریزاسیون روش مناسبی است.

❖ اندازه‌گیری ATP

❖ رادیو متری

❖ آزمون گلوکوروניداز

# روش‌های ایمنونولوژیکی

❖ الایزا (ELISA)

❖ آنتی کور فلوئورسنت

❖ آزمون (RADIO IMMUNO ASSAY) RIA

# روش‌های مولکولی

## PCR - ۱

- یکی از مهمترین پیشرفت‌ها در دو دهه اخیر در زمینه بیولوژی مولکولی بویژه در کاربردهای تشخیصی مواد غذایی، واکنش زنجیره پلیمراز (PCR) می باشد.
- به طور کلی PCR به روش ازدیاد مقادیر جزیی DNA یا RNA اطلاق می شود که امکان مشاهده آنها توسط روش های ساده و رایج آزمایشگاهی وجود دارد.
- قابلیت PCR در ازدیاد اسیدهای نوکلئیک موجود در نمونه مورد آزمایش موجب شناسایی سریع و اختصاصی نوع سلول یا میکروارگانیسم مورد نظر در نمونه مذکور می گردد که این ویژگی، آنرا به عنوان ابزاری مطمئن و حساس در زمینه پژوهش های علمی مطرح می سازد.



# PCR – A QUICK OVERVIEW

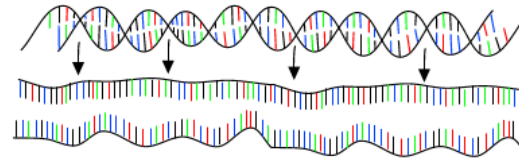
- DENATURATION - SEPARATE PARENT STRANDS IN PREPARATION NEW STRAND SYNTHESIS
- ANNEALING - “STICK” PRIMERS TO THE PARENT STRANDS TO PRIME DNA SYNTHESIS
- EXTENSION - ADDITION OF NUCLEOTIDES, ONE AT A TIME, TO THE GROWING END OF THE DNA STRAND (3' END) USING THE PARENT STRAND AS THE TEMPLATE

## PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps :

### Step 1 : denaturation

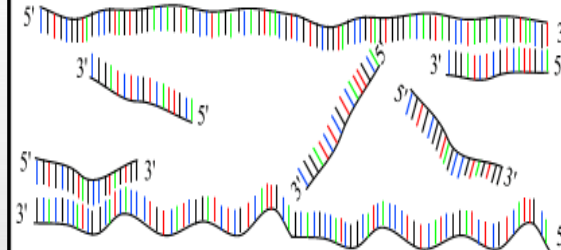
1 minut 94 °C



### Step 2 : annealing

45 seconds 54 °C

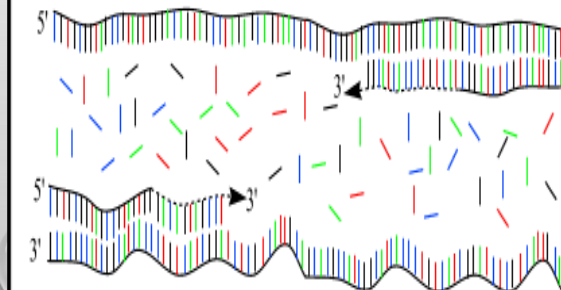
forward and reverse primers !!!



### Step 3 : extension

2 minutes 72 °C

only dNTP's



(Andy Vierstraete 1999)

## REAL- TIME PCR -2

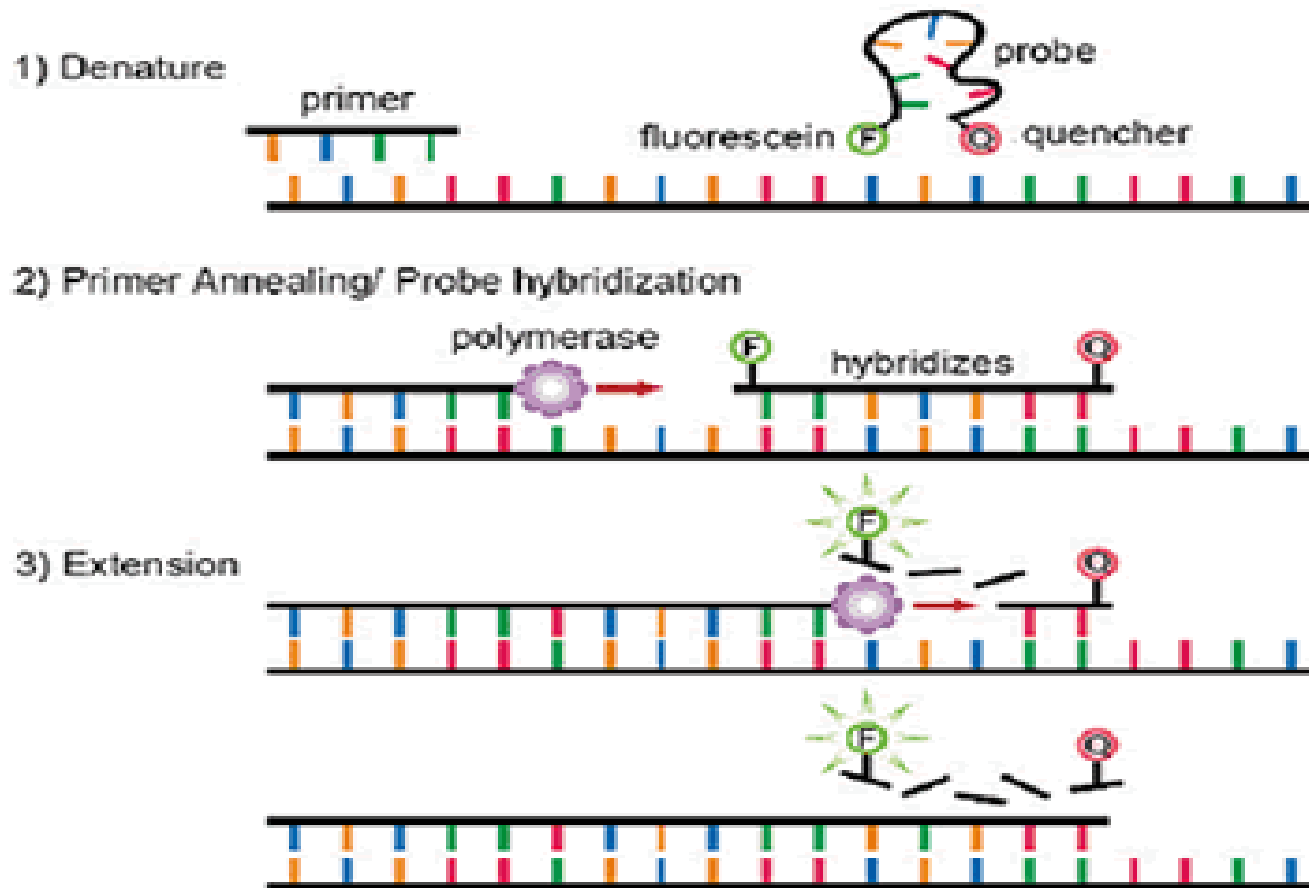
❖ از زمان معرفی روش PCR، این متد تحولات بسیاری را یافته که مکانیسم انجام و تشخیص حاصل از آن را شامل می شود.

❖ محققین شیوه ای را طراحی نمودند که به جای تعیین محصول با استفاده از روش الکتروفورز، محصول واکنش با استفاده از مواد نشانه گذاری ردیابی می شود.

❖ یکی از آنها پروب نشان دار است که قابلیت اتصال اختصاصی به ژنوم هدف را دارند.

❖ پروب نشانه گذاری در طی واکنش حضور داشته و در هر چرخه در طی تکثیر تجزیه شده و نور ساطع شده از آن در هر چرخه قابل اندازه گیری خواهد بود. این روش به REAL- TIME PCR شناخته شده است.

# Real-Time PCR مکانیسم



# REAL- TIME PCR

- در سالهای اخیر، تکنیک REAL-TIME PCR کمی یا qPCR در زمینه علوم و صنایع غذایی وارد شده است.
  - qPCR در مقایسه با روشهای سنتی مزیت های بسیاری دارند:
1. بسیار سریع هستند که از نظر اقتصادی بسیار حائز اهمیت است.
  2. امکان آنالیز کمی نمونه را در لحظه دارا بوده و در نتیجه نیاز به فرآیندهای بعدی مثل الکتروفورز نمی باشد.
  3. توانایی تشخیص آمین های بیوژنیک حاصل از باکتری ها در حجم زیادی از نمونه در مدت زمان کوتاه تر، یکی دیگر از فوائد بزرگ روش های qPCR در مقایسه با روش های سنتی می باشد.

## هدف اصلی

- طراحی کیت Taq Man Real Time به منظور تعیین سریع بار میکروبی شیرهای پاستوریزه

## اهداف فرعی

- تعیین میزان بار میکروبی شیرهای پاستوریزه با استفاده از محیط کشت به عنوان کنترل
- تعیین میزان بار میکروبی شیرهای پاستوریزه با استفاده از کیت Taq Man Real Time
- مقایسه دو روش Taq Man Real Time و کشت در تعیین با دقت میزان بار میکروبی شیر پاستوریزه

## فرضیه

- روش Taq Man Real Time در مقایسه با روش کشت سریعتر می تواند بار آلودگی میکروبی را در هر نمونه شیر پاستوریزه تعیین نماید.

A 3D rendering of a DNA double helix structure, showing the characteristic twisted ladder shape with red and white strands and colored rungs, positioned diagonally on the left side of the slide.

# روش پژوهش

## • تهیه نمونه

- در این مطالعه ۱۰۰ نمونه شیر پاستوریزه ۱/۵٪ چربی از ۹ برند رایج مورد استفاده در شهر تبریز در بسته بندی دو لایه پلاستیکی (دوی پک) از سوپر مارکت های فعال در عرصه توزیع شیر پاستوریزه در سطح شهر تبریز نمونه گیری شد. بلافاصله نمونه ها در آزمایشگاه بهداشت مواد غذایی مورد کشت میکروبی قرار گرفته سپس (۵۰ میلی لیتر) از ۲۷ نمونه در لوله فالكون تحت شرایط استریل برای آزمایشات بعدی به آزمایشگاه مولکولی دپاکو منتقل شد.





## مراحل کار

- مرحله اول :

- کشت میکروبی

- مرحله دوم :

- ✓ آماده سازی نمونه برای استخراج

- ✓ استخراج DNA

- ✓ آنالیز کمی DNA

- ✓ طراحی پرایمر

- ✓ PCR

- ✓ REAL- TIME PCR



## کشت میکروبی

- محیط کشت لازم پلیت کانت آگار است که محیطی عمومی برای رشد انواع میکروارگانیسم هاست و از محلول رینگر به عنوان محلول رقیق کننده استفاده می کنیم.
- سوسپانسیون اولیه (اولین رقت اعشاری) را براساس استاندارد ملی ایران شماره ۸۹۲۳-۱ تهیه می کنیم.
- روش کشت میکروبی بر اساس استاندارد ملی ایران شماره ۵۴۸۴ انجام شد.

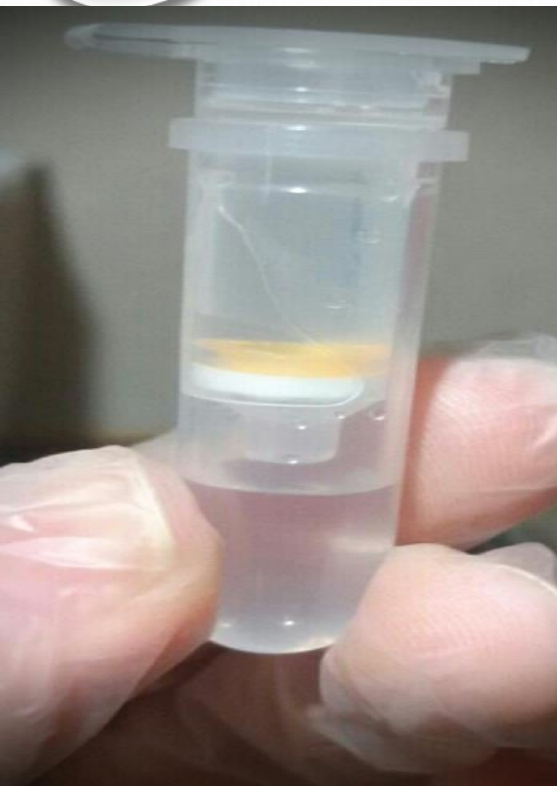
## آماده سازی نمونه برای استخراج

- نقطه شروع بسیاری از روشهای بیولوژی مولکولی ضرورت جداسازی DNA با کیفیت عالی است.

- ابتدا نمونه های شیر در سانتریفوژ تحت نیروی ۱۵۰۰ دور به مدت ۴۵ دقیقه قرار دادیم. سپس مایع رویی را دور انداخته و باقیمانده را با محلول PBS ۳ مرتبه شستشو دادیم، بدین صورت که پس از هر مرحله افزودن محلول PBS نمونه تحت نیروی سانتریفوژ قرار دادیم. سپس مایع رویی را دور انداخته و بعد از ۳ مرتبه تکرار عمل شستشو رسوب به دست آمده جهت استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفت.



# مراحل استخراج DNA



- افزودن ۱۸۰ میکرولیتر بافر تخریب به هر تیوپ
- افزودن ۲۰ میکرولیتر پروتئیناز K
- قرار دادن در آون ۵۶ درجه به مدت ۱۵ دقیقه
- افزودن ۲۰۰ میکرولیتر بافر BB
- قرار دادن در آون ۶۰ درجه به مدت ۱۰ دقیقه تا حصول رنگ شفاف
- افزودن ۱۰۰ میکرولیتر اتانول مطلق
- انتقال نمونه ها به میکروتیوپ های حاوی ستون های اتصال
- ستون ها را در میکروفتیوژ به مدت ۱ دقیقه با دور ۸۰۰۰ سانتریفوژ کردیم.
- ستون ها را یکی یکی و با دقت به تیوب های ۲ میلی لیتری جدید منتقل کرده و تیوب قبلی (حاوی محلول زیر ستون) را دور میریزیم.
- افزودن بافر شستشوی ۱ به میزان ۵۰۰ میکرولیتر



- ستون‌ها را پس از اولین شستشو در دور (rpm) ۸۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه سانتریفوژ می‌کنیم.
- بافر شستشوی شماره ۲ به میزان ۵۰۰ میکرولیتر را به ستون اضافه می‌کنیم.
- ستون‌ها را پس از دومین شستشو ۳ بار در دور (rpm) ۱۴۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه سانتریفوژ می‌کنیم.
- مجدداً ستون‌ها را یکی یکی و با دقت به تیوب‌های ۲ میلی لیتری جدید منتقل کرده و تیوب قبلی (حاوی محلول زیر ستون) را دور میریزیم.
- به میزان ۱۰۰ میکرولیتر بافر رها سازی را داخل ستون می‌ریزیم. و ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار می‌دهیم تا بافر کاملاً جذب ستون می‌شود.
- ستون‌ها را در دور (rpm) ۱۳۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه سانتریفوژ می‌کنیم.
- ستون‌ها را دور ریخته و محلول زیر ستون حاوی (DNA) می‌باشد.



# ارزیابی کمی DNA

- پس از استخراج DNA برای بررسی اولیه کمیت و کیفیت و میزان آلودگی آن به پروتئین و کربوهیدرات در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر از دستگاه بیوفتومتر استفاده می‌کنیم. با تزریق ۲ میکرولیتر محلول DNA به صفحه چشمی مخصوص میزان جذب نور اندازه‌گیری شد.



دستگاه بیوفتومتر

# طراحی پرایمر

- در این مطالعه توالی DNA ، ژن 16SrRNA و ژن EAE از باکتری اشرشیاکلی O157:H7 (ACCESSION NUMBER AF034253) به عنوان به ترتیب ژن هدف و ژن مرجع انتخاب شدند ، سپس با اخذ توالی ژن ها از سایت ، [www.NCBI.NLM.NIH.gov](http://www.NCBI.NLM.NIH.gov) با نرم افزار (P11.2 CITY, CA, USA)

PRIMER EXPRE VER.3.0 برای ژن های مورد مطالعه پرایمرهای اختصاصی طراحی می گردد.

پرایمر	سکانس	T <sub>m</sub>	Mw
Forward	5'- TCATCGCACCGTCAAAGGAACC - 3'	62.7	6673.3
Reverse	5'- GTGAAATTATCGCCACGTTCTGGGCAA - 3'	68.5	7995.1



*PCR*



# مواد و تجهیزات لازم برای PCR

- پرایمر FORWARD و REVERSE طراحی شده برای واکنش
- dd H<sub>2</sub>O
- TEMPLATE (DNA نمونه)
- PCR REACTION MIX به صورت آماده در کیت PCR، از شرکت BIONEER خریداری شده است.

Ready To Use Tube Of Master Mix	Reaction size
PCR Buffer pH 9.0	10mMol
Taq DNA Polymerase	1 U
MgCl <sub>2</sub>	1.5 mM
KCl	30 mM
dNTPs (dATP , dCTP , dGTP , dTTP)	250 μM

حجم نهایی واکنش ۲۰ میکرولیتر است. به این ترتیب: ۱ ML پرایمر F ، 1ML پرایمر R ،  
17 ML آب مقطر استریل را به REACTION MIX آماده در میکروتیوب اضافه می کنیم. سپس  
1ML از DNA TEMPLATE را به REACTION MIX اضافه می کنیم.





تیوپ حاوی مواد مورد نیاز PCR

تیوپ حاوی مسترمیکس و DNA استخراج  
شده



# مواد نیاز برای الکتروفورز

- پودر آگاروز ۶ گرم

- اتیدیوم بروماید

- بافر TAE 50X

- LOADING BUFFER

- DNA LADDER

- آب مقطر



## مواد مورد نیاز برای بافر TAE

وزن (گرم)	مواد تشکیل دهنده:
۲۴۲	Tris ( $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ ; $M = 121/14$ )
۱۸	EDTA ( 0/5 M)
۱/۵۷	Acetic Acid

# مواد و تجهیزات مورد نیاز برای الکتروفورز

- کست (CAST) و کمب (COMB)

- تانک الکتروفورز

- میکروویو

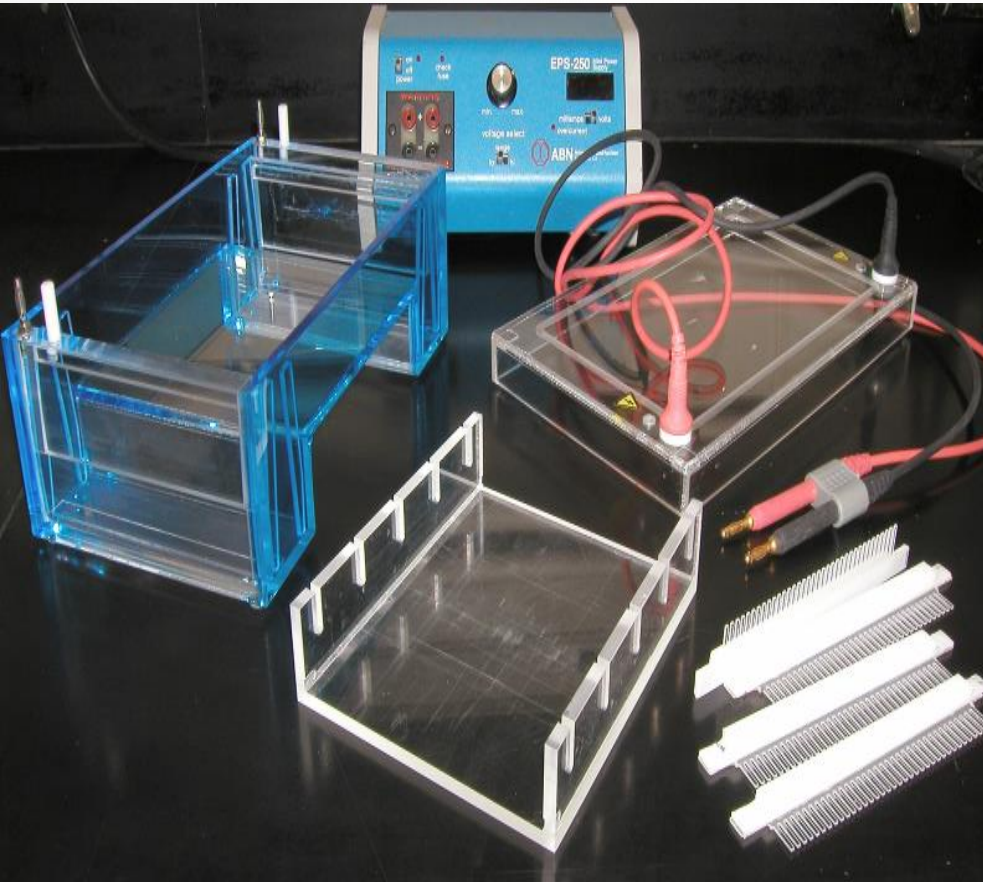
- POWER SUPPLY

جهت برقراری جریان الکتریکی در تانک الکتروفورز

- دستکش

- سمپلر و سر سمپلر

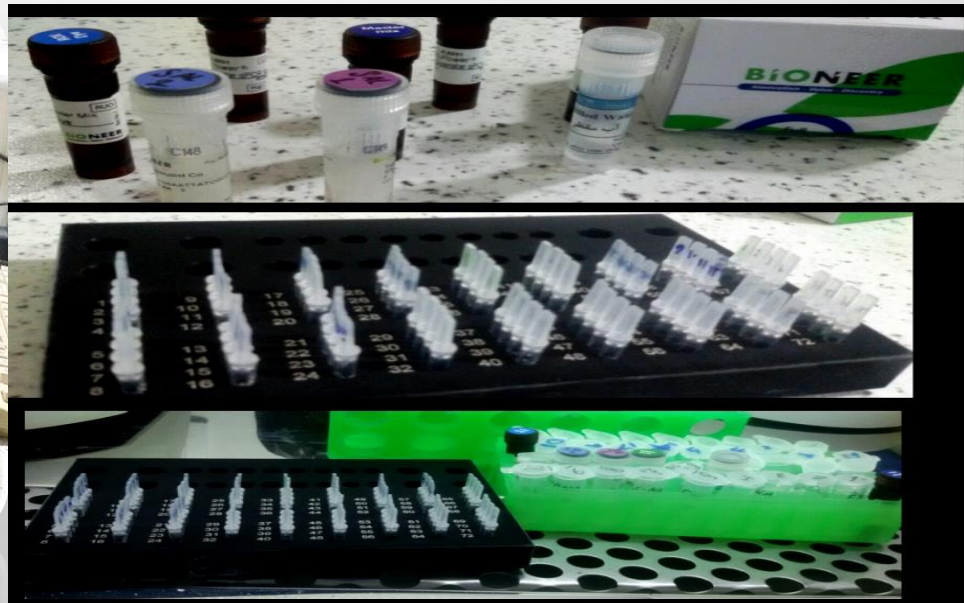
- دستگاه عکسبرداری





# Real- Time PCR

- در این مطالعه از مدل روتوژن ۶۰۰۰ دستگاه QIAGEN ساخت کشور آمریکا استفاده شده است.
- برنامه زمانی- گرمایی دستگاه در سه مرحله انجام می شود. و فعال شدن DNA در مرحله اول که منجر به دناتوره شدن مولکول های آنزیم پلیمراز می گردد، به صورت ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه؛ مرحله دوم ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه و ۶۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه برای ۴۰ سیکل متوالی انجام می شود.



# مواد مورد نیاز REAL TIME PCR

- PCR REACTION MIX به صورت آماده در کیت PCR،

- پرایمر REVERSE و FORWARDED

- ddH<sub>2</sub>O

- ROX 50

- پروب Taq Man

- میزان مواد مورد استفاده در جدول زیر آمده است.

Reaction	Master Mix	ddH <sub>2</sub> O	Template	Primer F	Primer R	Total
Size	5μl	3μl	1	1	1	10

# ● آنالیز آماری دو روش کشت و REAL-TIME PCR

- این آنالیز با استفاده از برنامه GRASS PAD ورژن ۵ روش BLAND-ALTMAN انجام شد.

یافته ها

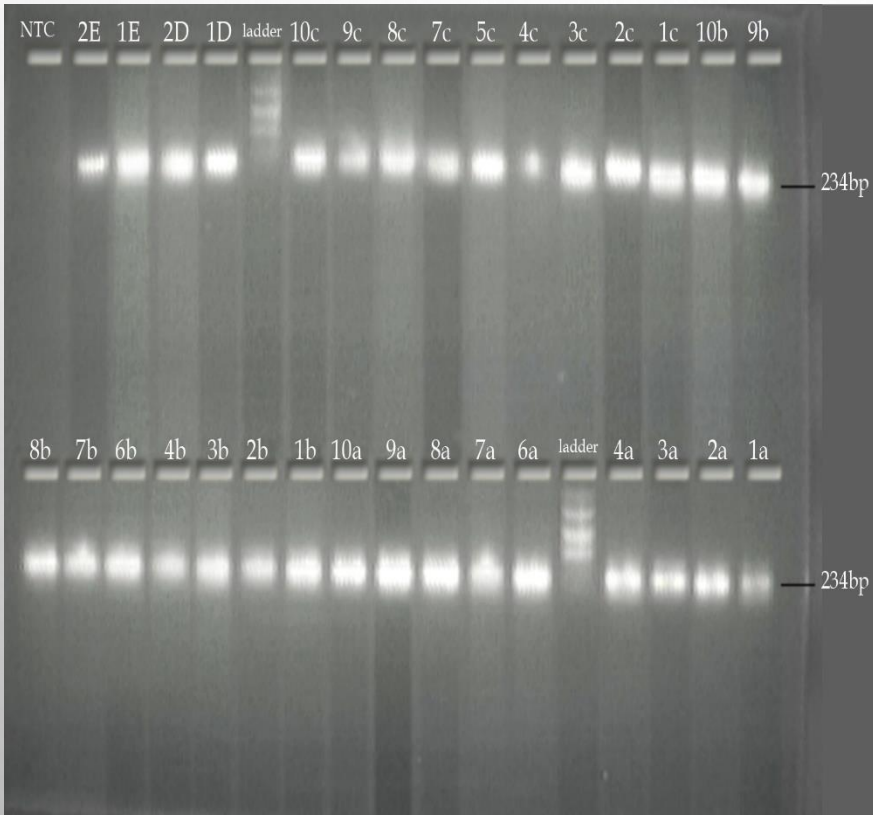
## نتایج حاصل از شمارش کلی

فصل	تعداد نمونه	داده ها			حد مجاز ( $10^3$ cfu/ml)	میزان آلودگی
		میانگین $\pm$ انحراف معیار	ماکزیمم	مینیمم		
فصول گرم	۵۰	$2/5453 \pm 0/54$	۴/۴۷	۰/۰۰	% ۳۳/۳	% ۳۳/۳
فصول سرد	۵۰	$2/8087 \pm 0/34$	۴/۵۴	۰/۰۰	% ۳۳/۳	% ۳۳/۳

# ارزیابی کمی DNA استخراج شده و نسبت جذب نور در طول موجهای ۲۶۰ و ۲۸۰

نمونه ها	$\mu\text{g/ml}$	260:280	260:230
لاله بناب	۱۴/۹	۱/۳۹	۰/۵۸
عشایر	۹/۸	۱/۷۳	۱/۰۶
کوهساران	۳/۲	۲/۱۳	۰/۹۴
پگاه	۵۰/۵	۱/۰۹	-
دامنه سهند تبریز	۱۱۱/۲	۱/۷۴	۱/۳۵
گل اوغلی	۲۷/۲	۱/۱۹	-
گلدن	۱۸/۱	۱/۳۸	۰/۲۵
سوتچی لر	۶۱/۸	۱/۶۱	-
دردانه	۲۹/۰	۱/۱۰	-

# تصویر الکتروفورز

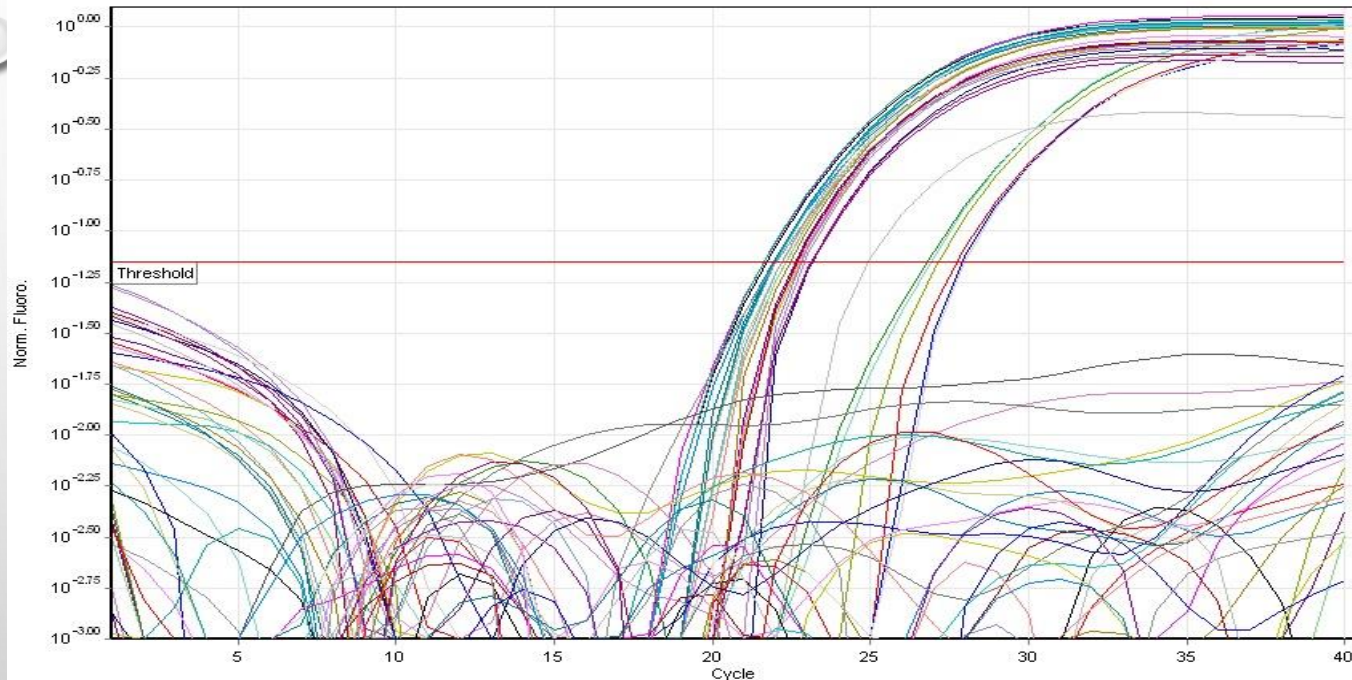


- تصویر الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره ای پلیمرز
- مارکر یا LADDER مورد استفاده با اندازه 100 BP



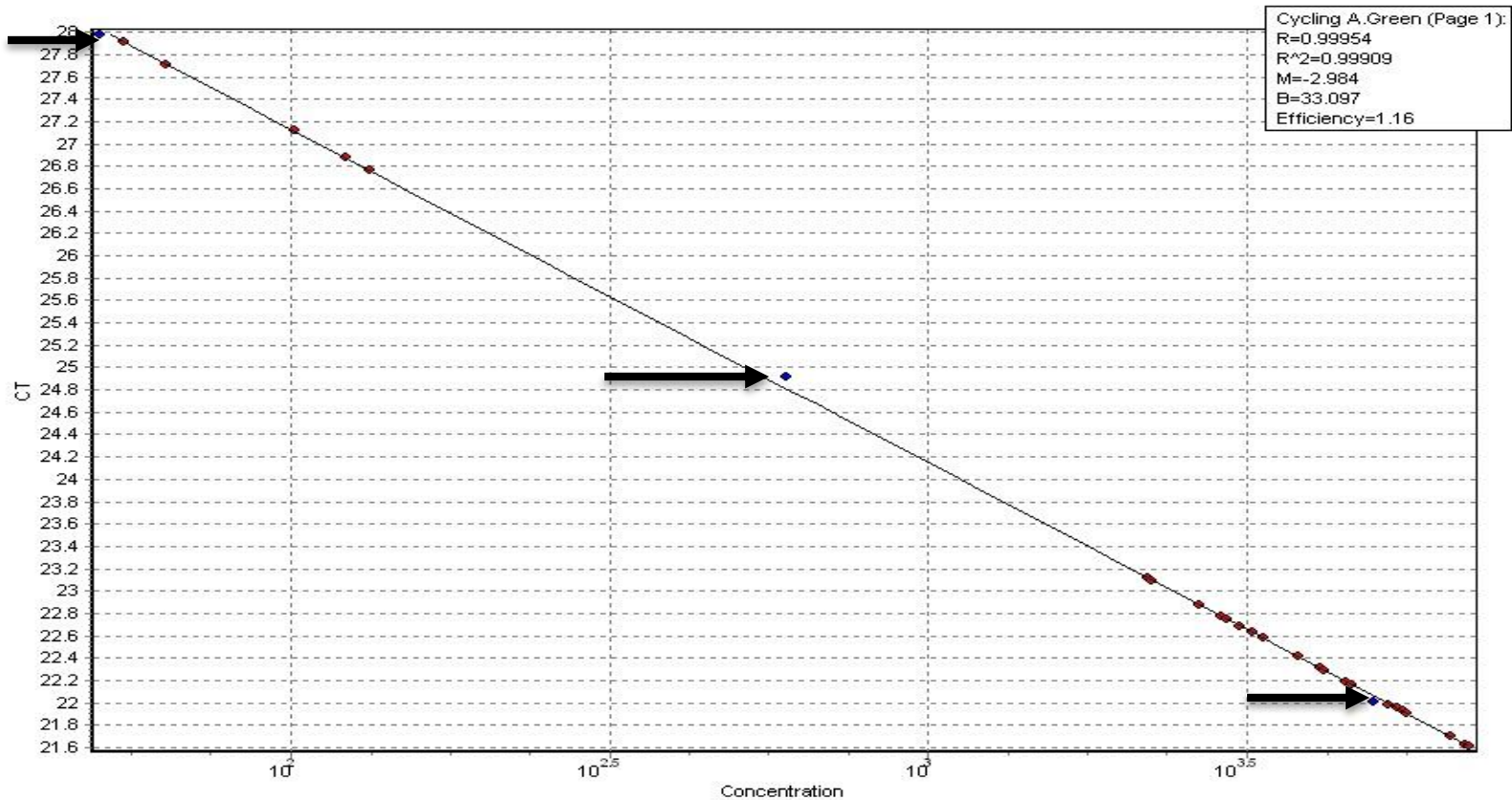
# نتایج شمارش Real-Time PCR

• منحنی CT



- نور فلورسانت ساطع شده از هر نمونه در برابر تعداد چرخه ها در شکل فوق رسم شده است.
- تقاطع خط THRESHOLD با نور آزاد شده CT مربوط به هر نمونه را نشان می دهد.

# منحنی استاندارد



- منحنی استاندارد که CT در محور Y و میزان DNA اولیه را در محور X را نشان می‌دهند.

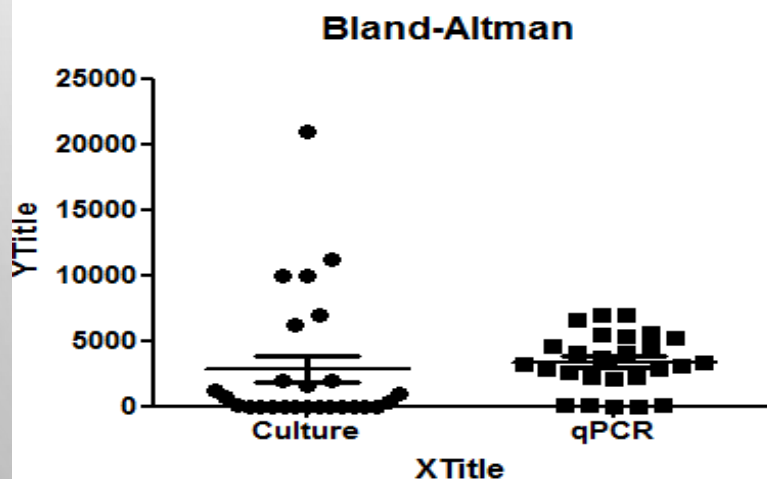
شیب خط، عرض از مبدأ، ضریب همبستگی برای ارائه اطلاعات در مورد عملکرد واکنش در جدول فوق آمده است.

Threshold	<b>0.0702</b>
Standard Curve (1)	$\text{conc} = 10^{(-0.335 \cdot \text{CT} + 11.093)}$
Standard Curve (2)	$\text{CT} = -2.984 \cdot \log(\text{conc}) + 33.097$
Reaction efficiency (*)	$(* = 10^{(-1/m)} - 1) 1.1635$
M	-2.98369
B	33.09691
R Value	0.99954
R <sup>2</sup> Value	0.99909

	نام شرکت سازنده	Ct	نتایج نتیجه کشت cfu/ml	Given Conc (copies/ml)	نتایج PCR شمارش (copies/ml)
A <sub>1</sub>	لاله بناب	۲۷/۷۲	۰		۶۴
A <sub>2</sub>	عشایر	۲۲/۷۵	۱۱۳۰		۲۹۴۰
C <sub>3</sub>	عشایر	۲۲/۱۶	۰		۴۶۱۹
C <sub>2</sub>	دردانه	۲۲/۷۷	۱۳۰۰		۲۸۸۵
	Standard	۲۷/۹۸		۵۰	۵۲
	Standard	۲۴/۹۱		۶۰۰	۵۵۴
	Standard	۲۲/۰		۵۰۰۰	۵۲۲۲
C <sub>1</sub>	سوتچی لر	۲۲/۸۷	۰		۶۹۵
B <sub>9</sub>	سوتچی لر ۲	۲۲/۴۱	۲۰۰۰		۳۸۰۴
B <sub>2</sub>	پگاه	۲۳/۱۰	۱۰۰۰		۲۲۴۸
B <sub>7</sub>	گلدن	۲۱/۶۱	۷۰۰۰		۷۰۷۱
B <sub>6</sub>	گل اوغلی	۲۱/۹۵	۰		۵۴۴۵
B <sub>4</sub>	کوهساران	۲۳/۱۲	۲۱۰۰		۲۲۰۷
B <sub>3</sub>	عشایر	۲۳/۱۲	۲۰۰۰		۲۲۱۰

# آنالیز آماری دو روش کشت و REAL-TIME PCR

- با توجه به مقدار بالای BIAS (تفاوت بین میانگین ها در دو روش استفاده شده) و نیز دامنه توافق بسیار بزرگ از ۱۰۸۶۶- الی ۹۷۶۲ نمی توان گفت که دو روش اندازه گیری نتایج مشابهی بدست می دهند.



# بحث و نتیجه گیری

- امروزه علاوه بر روشهای فنوتیپی، بیوشیمیایی و ایمونولوژیکی، روشهای جدیدتر شامل روشهای مولکولی نیز گسترده شده است که به عنوان یک روش جایگزین و مکمل روشهای فنوتیپی می-باشند.

- در سالهای اخیر، تکنیک REAL-TIME PCR کمی یا qPCR در زمینه علوم و صنایع غذایی وارد شده است. در واقع qPCR در حال حاضر، در مدیریت تقریباً تمامی مشکلات ایمنی و کیفیت مواد غذایی وارد شده است. یکی از کاربردهای موفق آن در تشخیص و شناسایی پاتوژن های مواد غذایی می باشد.



- در مطالعه حاضر، برآن شدیم از روش نوین، سریع، و دقیق در شناسایی میکروارگانیزم‌ها در مواد غذایی به عنوان جایگزین روش‌های سنتی استفاده کنیم.
- با هدف قرار دادن یک توالی از ژن ۱۶S rRNA توسط پرایمر و پروب و با روش TaqMan توسط دستگاه روتوژن ۶۰۰۰، بار میکروبی شیرهای پاستوریزه تولید و عرضه شده در سطح شهر تبریز اندازه گیری شد.
- به منظور بررسی و تطبیق نتایج حاصل با روش‌های سنتی، یکبار هم از روش کشت مرسوم بر اساس استاندارد ملی ایران نیز برای اندازه گیری بار میکروبی استفاده شد.

- بر اساس نتایج حاصل از کشت، از ۱۰۰ نمونه شیر پاستوریزه ۳۳/۳٪ درصد از نمونه‌های شیر پاستوریزه دارای بار میکروبی بیش از حد مجاز استاندارد ایران بود. مقادیر بیشینه و کمینه به ترتیب، (cfu/ml) ۱۰۰۰۰ و ۰ بود.

- مطالعه مشابهی که در بوشهر در سال ۱۳۹۱ انجام شد و میزان آلودگی میکروبی شیرهای پاستوریزه ۳۵٪ گزارش شده، در مطالعه ای در یزد از ۱۹۸ نمونه شمارش کل باکتریها در ۲۰ نمونه ۱۰/۱٪ بیش از حد مجاز بوده است. در این مطالعه هیچ مورد آلودگی به اشریشیاکلی گزارش نشده است.

- مطالعات مشابه دیگری در خصوص آلودگی شیر پاستوریزه بخصوص آلودگی به میکروارگانیسم- های شاخص مثل اشیریشیاکلی انجام شده است. در مشهد میزان آلودگی به اشیریشیاکلی ۱/۱۲٪ و در تهران نیز ۴/۳٪ از نمونه های شیر پاستوریزه مربوط به فصول گرم، گزارش شده است.
- نتایج ارائه شده در شمارش کشت میکروبی مطالعه حاضر حاکی از اهمیت بالای پاستوریزاسیون و همچنین مناسب بودن بسته بندی و حفظ زنجیره سرما به منظور اعمال شوک حرارتی و از بین بردن میکروب های بیماریزا می باشد. و نشان می دهد کیفیت شیر پاستوریزه ارائه شده در سطح شهر تبریز از نظر بهداشت در سطح مطلوب قرار دارد.

- در نتایج شمارش حاصل از qPCR برخی از نمونه‌ها مانند گل اوغلی، نتایج با روش کشت • (cfu/ml) و با روش qPCR ۵۴۴۵ (copies/ml) و نمونه شیر پگاه به ترتیب • (cfu/ml) و ۳۲۲۱ (copies/ml) شمارش شده است.

- با تطبیق نتایج حاصل از REAL TIME PCR و کشت با استفاده روش Bland-Altman Plot مشاهده شد که اختلاف میانگین نتایج دو روش بالاست.

- با بررسی نتایج qPCR و نمودارهای حاصل از Bland-Altman Plot، مشاهده شد که نتایج روش qPCR متمرکزتر بوده و کمتر پراکنده است. این همگن بودن نتایج از برتری های آزمایش خاص مثل qPCR است که این موضوع در صنایع غذایی که حجم تولید بالاست بسیار حائز اهمیت است.

- در مطالعه‌ای، HEIN و همکاران در سال ۲۰۰۵ با ارزیابی میزان آلودگی شیرهای غیر پاستوریزه به استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از روش REAL-TIME PCR و روش کشت مشاهده کردند که ۱۹/۱٪ از نمونه‌ها در روش qPCR، مثبت است و بر اساس ضریب کاپا، تطابقضعیفی بین نمونه‌ها برقرار است.

- در مطالعه‌ای توسط MARKEL و همکاران در سال ۲۰۱۰ انجام شد، به منظور شمارش مخمر در فرآورده‌های لبنی و همچنین تشخیص گونه‌های فرصت طلب بیماریزا مخمرها از تکنیک qPCR استفاده شد. بر اساس آن تعداد سلولهای شمارش شده ۱۰ مرتبه بیشتر از روش کشت شمارش شد. مشابه چنین نتایجی در مطالعه MARTINEZ و همکاران آمده است. که دلیل آن توانایی بالای QPCR در شمارش سلولهای زنده و غیر قابل کشت و عدم شمارش آن توسط روش‌های مبتنی بر کشت ذکر شده است.

- برای توضیح این اختلاف و عدم توافق نتایج دو روش دلایل مختلفی وجود دارد: ۱- به دلیل توانایی این تکنیک در شمارش سلول‌های مرده و زنده ۲- سلول‌های زنده ای که قابلیت رشد در محیط‌های کشت را ندارند اما توسط qPCR شناسایی و شمارش شده اند. ۳- هر کلنی شمارش شده در روش کشت ممکن است در نتیجه تولید بیش از یک سلول باشد و میتواند بیانگر اهمیت پاستوریزاسیون نیز باشد که میکروارگانیسم‌ها از بین رفته اند و آنچه باقی مانده میکروارگانیسم‌های مرده هستند که آن هم در روش qPCR شمارش شده اند.



## نتیجه گیری

- تکنیک REAL TIME PCR، به عنوان یک روش کاربردی و دقیق میتواند برای بررسی و شمارش میکروارگانیسم های شیر پاستوریزه به کار رود. اگرچه این نتایج نسبت به نتایج شمارش با روش کشت دارای میزان بالاتری است، اما این اختلاف میتواند ناشی از عدم رشد برخی از میکروارگانیسم ها در محیط کشت و شمارش و تکثیر DNA سلولهای مرده با روش QPCR باشد. توانایی شمارش کمترین حد از میکروارگانیسم ها در نمونه شیر پاستوریزه ( CFU/ML ۵۵)، خود نشان دهنده حساسیت بالای این تکنیک می باشد.

## پیشنهادات

- استفاده از روشهای مختلف جهت استخراج DNA برای اطمینان از خلوص هر چه بالاتر DNA استخراج شده
- بکارگیری و استفاده از تکنیک TAQ MAN REAL TIME PCR برای شمارش و شناسایی میکروارگانیسم های بیمارزا و عامل مسمومیت در سایر فراورده های لبنی و مواد غذایی
- استفاده از تکنیک REAL TIME PCR برای شناسایی باکتری های پاتوژن بیماریزاد
- به منظور حل مشکلات مربوط به شمارش میکروارگانیسم های زنده و مرده در روش qPCR پیشنهاد می شود در مطالعات بعدی از رنگ پروپیدیوم یدید استفاده شود تا بتواند میکروارگانیسم های زنده شمارش شود.